

ショウジョウバエ雌の性的受容性を制御する遺伝子及び神経基盤の解析

著者	櫻井 晃
号	9
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第218号
URL	http://hdl.handle.net/10097/60058

さくらい あきら

氏名（本籍地）	櫻井 晃
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第218号
学位授与年月日	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生命機能科学専攻
論文題目	ショウジョウバエ雌の性的受容性を制御する遺伝子及び神経 基盤の解析
博士論文審査委員	（主査） 教授 山元 大輔 教授 八尾 寛 准教授 筒井 健一郎

論文内容の要旨

本能はいかにして実現されるのか。本能とは、経験によって成立する学習行動とは異なり、生得的な行動様式である。動物は食物を摂取し、眠り、そして繁殖につながる性行動をする。誰かが食べること、眠ること、あるいは求愛することを教えたわけではないにも関わらず、動物達は当然のようにこれらを営む。では、何が本能を規定しているのか。生得的に備わっているものならば、生体の構造が遺伝的プログラムにそって、あらかじめ決められたかたちにつくられるように、本能行動も遺伝的プログラムの発露と見なすことができるであろう。そうした遺伝的プログラムにくりいが生ずれば、行動に変化が現われるはずである。本研究で取り上げる *spinster (spin)* 遺伝子は、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の雌が雄の求愛に対して激しい拒否行動を取り、交尾が成立しない突然変異の原因遺伝子として同定された。このことは、*spin* 遺伝子並びに *spin* 遺伝子の働く神経回路が、求愛してきた雄を受け入れて雌が交尾するか否か、この意思決定を左右する高次な脳機能に関与している可能性を示唆している。キイロショウジョウバエの雌は求愛してくる雄から様々な刺激を受容する。例えば求愛歌や雄のフェロモン、そして雄による雌の腹部への接触などである。雌はこれらの情報に基づいて雄の求愛を受け入れるか否かという意味決定をし、受け入れる場合は膣口を開き、そうでなければ拒否行動をとる。こうした雌による交尾の意思決定は性淘汰などの進化の諸過程において重要な役割を果たすと考えられる。そこで、本研究では *spin* が脳内のどの神経細胞でどのような機能を発揮するのかを調べることによって、本能行動の制御という高次な脳機能を司る神経基盤、すなわち、感覚入力から意思決定、そして行動までの脳内情報処理の要として働いている機構の一端を理解することを目指した。

spin は線虫からヒトに至るまで高度に保存されており、その産物タンパク質は複数回（8回または12回とされる）膜を貫通し、MFS（major facilitator superfamily）トランスポーターと弱いホモロジーをもつが、その具体的な機能についてはほとんどわかっていない。そのため、どのようにして雌の性的受容性に影響を与えるのかはわかっていない。そこで、*spin* がどのような遺伝子と相互作用を持つのかを調べることによって *spin* 機能の解明を試みた。精巣内の生殖細胞を覆うシスト細胞で *spin* を強制発現させると、本来は精巣後端部に局在する成熟した精子が精巣先端部へと浸潤するという優性表現型が観察された。そこで、任意の遺伝子を *spin* と共に精巣シスト細胞に強制発現させ、*spin* を単独で強制発現させた際に見られる優性表現型に対して、修飾作用をもたらす遺伝子を探索した。その結果、*atg8a* は *spin* と類似の機能を有し、*thread* と *emc* はそれぞれ *spin* に対して抑制的に働くことが示唆された。*atg8a* はプロテオソーム系と並ぶ重要な細胞内分解システムであるオートファジーの誘導に必須である。オートファジーにおいては、細胞内小器官や長寿命のタンパク質複合体などの高分子がリソソームへと運搬されて分解される。*Spin* タンパク質はリソソームに局在することが報告されており、また *spin* 変異体成虫の中樞神経系では、自家蛍光を放つ物質の異常な細胞内蓄積を伴う神経変性が観察される。オートファジーによる細胞内の老廃物の分解が損なわれると、神経変性を起こし

やすくなるという報告もある。以上から、*spin* はオートファジーを含むリソソーム機能を通じて、神経細胞の変性の防止に寄与している可能性が考えられる。*thread* と *emc* は、いずれも細胞死を抑制する機能を持つ。また、*spin* 変異体の中枢神経系においては発生の過程で必要とされるプログラム細胞死の減少（不全）が報告されている。これらの知見から、*spin* は細胞死を促進する機能を有することが想定できる。また、オートファジーによる消化機能が亢進すると、細胞死が引き起こされることが知られており、このオートファジーによる細胞死は正常な発生過程に必須であることが明らかになってきている。*spin* は、細胞内分解の制御を通して発生過程のプログラム細胞死や成虫期の神経変性の防止に関わっている可能性が考えられる。

本研究ではさらに、雌が正常な性的受容性を示すために *spin* 機能が必要とされる細胞の同定を試みた。*spin* 変異体の性的受容性の著しい低下は、*GAL4/UAS* システムを用いた *spin*⁺cDNA の発現により救済されることが示されている。*GAL4* は酵母由来の転写因子で *UAS* 配列に結合し、その下流側の配列の転写を促進する。*spin* 変異体の表現型を救済する実験の場合、*GAL4* をコードする配列の上流に *spin* 遺伝子の 5'側推定転写調節配列を、*UAS* 配列の下流に *spin*⁺cDNA をつないでいる (*spin-GAL4*, *UAS-spin*⁺)。この組合せを用いると、*spin* 遺伝子が本来発現する場所とタイミングにおいて *GAL4* タンパク質が発現し、*spin*⁺cDNA の発現を促進する。その結果、*spin* 変異体雌の交尾に対する受容性の回復が見られた。つまり、*spin-GAL4* を発現する細胞の中に性的受容性の制御に重要な役割を担う細胞が含まれていると推測される。成虫期以前の発生の過程においては、*spin-GAL4* の発現は主にグリア細胞でみられ、神経細胞ではほとんどみられない。一方で、成虫の神経系においては、神経細胞とグリア細胞の両方で *spin-GAL4* の発現がみられる。そこで、雌の性的受容性の制御における神経細胞及びグリア細胞での *spin* の役割をそれぞれ検討した。具体的には、*spin* 変異体雌において神経細胞特異的またはグリア細胞特異的に *spin*⁺を発現させ、性的受容性が救済されるかを調べた。さらに、RNA 干渉法による神経細胞特異的またはグリア細胞特異的な *spin* ノックダウンを行い、雌の性的受容性への影響を調べた。その結果、雌の性的受容性の制御において *spin* は神経細胞で必要とされ、グリア細胞における *spin* 発現は雌の正常な性的受容性に必須ではないことが確認された。*spin-GAL4* の発現が神経細胞でみられるようになるのは成虫期以降であることを考えると、発生過程での細胞死の制御よりも、成虫中枢神経系での細胞内分解の制御による神経変性の防止のほうが、より直接的に雌の性的受容性の制御に関与していることが推察される。

次に、どの神経細胞における *spin* 機能が雌の性的受容性の制御に重要であるのかを調べた。具体的には、MARCM (mosaic analysis with a repressible cell marker) 法により、まず雌の脳内に *spin* 変異細胞クローンを無作為に作出し、その性的受容性を調べた。次に、その個体を解剖して脳を摘出し、*spin* 変異細胞を同定した。そして、雌個体の性的受容性と高く相関して *spin* 変異細胞となっていた脳細胞を探索した。その結果、性的受容性を制御する神経細胞候補として二つの神経細胞群（それぞれ Cluster A、Cluster D と呼ぶ）が同定され

た。Cluster A はこれまでに報告のない神経細胞群であり、その機能は不明である。Cluster A は食道下神経節へ投射している。その投射領域は、聴覚受容細胞や既に雌の性的受容性の制御に関与することが示唆されている *ppk*⁺神経細胞の投射領域の近傍である。今後、Cluster A とシナプス接続する神経細胞の探索を通して、Cluster A の性的受容性の制御における役割が解明されることが期待される。一方、Cluster D は嗅覚情報を伝える二次投射神経細胞からなる細胞群である。一つの嗅覚二次投射神経細胞は、同一の嗅覚受容体を発現する一群の嗅受容細胞とシナプスを形成する。Cluster D には、異なる嗅覚受容体を発現する 6 種類の嗅受容細胞とそれぞれ特異的にシナプスを形成する 6 種類の嗅覚二次投射神経細胞が含まれている。そこで、どの嗅受容細胞が担う嗅覚情報が雌の性的受容性の制御に重要であるのかを、嗅受容細胞における発火抑制及び *spin* ノックダウン実験により調べた。その結果、嗅覚受容体 Or47b を介して受容される嗅覚情報が、雌の性的受容性の制御に関わっており、その情報伝達を担う Or47b 発現嗅受容細胞では *spin* 機能が必要であるということが示唆された。Or47b 発現嗅受容細胞は神経系の性決定因子である *fruitless* を発現しており、キイロショウジョウバエにおいてキイロショウジョウバエの匂いに応答することが報告されている。先行研究の中では、Or47b 発現嗅受容細胞が、配偶行動の過程において同種の匂いの弁別に寄与している可能性が挙げられている。Or47b 発現嗅受容細胞は、キイロショウジョウバエそのものの匂いの受容を通して、雌の性的受容性を高める働きをしていることが推測される。さらには、Or47b 発現嗅受容細胞によって弁別される雄の匂いの種間差が、雌の交尾相手の嗜好性に関わり、近縁種間の生殖隔離に寄与しているという可能性も考えられる。

spin は Cluster A、そして Or47b 発現嗅受容細胞からの接続を受ける Cluster D において、老廃物の細胞内蓄積を抑え、それらを通じて神経変性を防止することによって、雌が正常な性的受容性を持つことに寄与しているのではないかと考えられる。

論文審査結果の要旨

本研究の目的は、キイロショウジョウバエの雌が雄の求愛を受け入れて交尾するかどうか（性的受容性）、この“意思決定”を規定する遺伝子機構ならびに細胞機構を明らかにすることである。主たる研究対象は、雌が求愛する雄を拒否して交尾のほとんど成立しない突然変異体 *spinster* (*spin*) と、その原因遺伝子 *spin* である。

遺伝子機構の研究では、生化学的作用が不明の *spin* 遺伝子産物の機能を探るため、表現型レベルで *spin* と相互作用する遺伝子を探索した。まず、スクリーニング系として、正常型 *spin* (*spin*⁺) を精巢原基に強制発現させるシステムを確立した。*spin*⁺ を強制発現された精巢原基では、本来未分化の生殖細胞で占められる先端部に、分化した精子が多数入り込む“精子侵入形質”を示す。*spin*⁺ に加えて任意の遺伝子を同時に強制発現させ、精子侵入形質を修飾するものをスクリーニングした結果、*spin* の抑圧遺伝子として *thread* と *emc*、*spin* と同様の表現型を引き起こすものとして *atg8* を同定した。この 3 遺伝子は全てリソソームの細胞内分解系の制御に関わることが知られていることから、*spin* もまたこのシステムの構成要素であり、おそらくオートファジーの促進に寄与するものと考えられた。

次に、性的受容性のニューロン機構の解明をめざし、ここに関与するニューロンの同定を行った。*spin* 変異ヘテロ接合の雌の脳内に *spin* 変異ホモ接合 (*spin*⁻と表記する) の細胞を少数、染色体組換えによって作り出し、そのモザイク雌が *spin* 変異体として振る舞う（交尾を拒否する）か、野生型として振る舞う（交尾を受け入れる）かを行動アッセイによって決定した。続いてそれらの雌から脳を摘出し、GFP 標識を頼りに *spin*-細胞を同定した。拒否行動を示した雌で *spin*⁻ となる確率が有意に高い細胞として、食道下神経節の局所介在ニューロン群の Cluster-A と、嗅覚二次投射介在ニューロン群の Cluster-D とを同定した。Cluster-A は従来記載されたことのない未知の細胞集団であるが、すでに性的受容性の制御への関与が示唆されている雌生殖器からの上行性機械感覚ニューロンと接続を持つ可能性が考えられた。また、Cluster-D では、フェロモン情報を感知する Or47b 受容体由来の入力を受けるニューロンが性的受容性に関与していた。こうして、雌の交尾意思決定に関わる中枢ニューロンが初めて同定された。

以上の成果は、櫻井晃が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、櫻井晃提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。